

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



INTERNATIONALE
ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. Februar 2003 (20.02.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/014287 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁵: C12C 3/08, 3/10, A61K 35/70 (74) Anwalt: ADAM, Holger; Kraus & Weisert, Thomas-Wimmer-Ring 15, 80539 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP0208943

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FL, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TI, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum: 9. August 2002 (09.08.2002)

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GB, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), erasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BR, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

Veröffentlicht:

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
(39) Angaben zur Priorität:
101 39 479.9 10. August 2001 (10.08.2001) DE

mit internationalem Recherchebericht

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von (51)): DR. WILMAR SCHWABE GMBH & CO. (DE/DE); Wilmar-Schwabe-Straße 4, 76227 Karlsruhe (DE).

Zur Erklärung der Zweitbuchsstab-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder: und

(73) Erfinder/Anmelder (nur für US): ERDELMAYER, Clemens (DE/DE); Glogauer Straße 32, 76139 Karlsruhe (DE); KOCH, Egon (DE/DE); Am Glashäuschen 11a, 76229 Karlsruhe (DE).

(54) Titel: HOPS EXTRACTS, METHOD FOR THE PRODUCTION AND USE

(54) Bezeichnung: HOPFENEXTRAKTE, VERFAHREN ZU IHREER HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to novel hops extracts with an increased content in prenylated chalcones and flavones. The invention also relates to a method for producing the same, to pharmaceutical preparations comprising such hops extracts and to the use of the hops extracts in the prophylaxis and therapy of conditions that are caused by estrogen deficiency or by a dysregulation of the sex hormone metabolism.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben sind neue Hopfenextrakte mit erhöhtem Gehalt an prenylierten Chalkonen und Flavonen. Verfahren zu ihrer Herstellung, pharmazeutische Zubereitungen umfassend solche Hopfenextrakte sowie die Verwendung dieser Hopfenextrakte zur Prophylaxe und Therapie von Krankheitszuständen, die durch einen Mangel an Östrogenen oder durch Dysregulationen des Geschlechtschromontostoffwechsels hervorgerufen werden.

WO 03/014287 A1

5. Hopfenextrakte, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft Hopfenextrakte, Verfahren zu ihrer Herstellung und die Verwendung von Hopfenextrakten 10 zur Prophylaxe und Therapie von Krankheitszuständen, die durch einen Mangel an Östrogenen oder durch Dysregulationen des Geschlechtshormonstoffwechsels, insbesondere des Östrogenstoffwechsels, hervorgerufen werden.

15 Die größte Bedeutung des Hopfens liegt nach wie vor in seiner Verwendung bei der Bierherstellung. Aufgrund seiner Bitter- und Aromastoffe ist er für den Geschmack des Bieres ausschlaggebend. Darüber hinaus haben diese Stoffe wegen ihrer antimikrobiellen Eigenschaften eine gewisse Bedeutung 20 bei der Konservierung des Bieres.

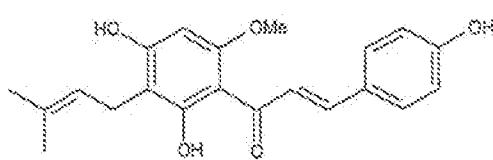
Das zu Beginn der achtziger Jahre vorliegende wissenschaftliche Erkenntnismaterial zum Hopfen führte zu einer positiven Monographie durch die Kommission E des 25 damaligen Bundesgesundheitsamtes (Banz. vom 5. Dezember 1985 bzw. 13. März 1990). Damit ist die Verwendung des Hopfens bei Einschlafstörungen, Unruhe und Angstzuständen grundsätzlich zugelassen.

30 Der Hopfen besitzt schon seit langer Zeit eine arzneiliche Bedeutung als mildes Sedativum in der Volksmedizin. Verantwortlich für diese Wirkung sind wahrscheinlich die oxidationsempfindlichen α - und β -Bittersäuren. Für diese

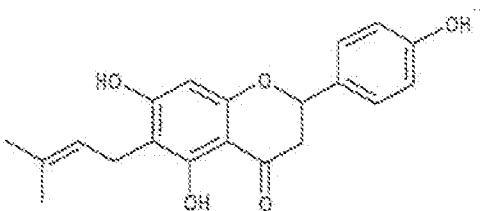
Inhaltsstoffe wurden in jüngerer Zeit auch Radikalfängereigenschaften sowie die Lipidperoxidation hemmenden Eigenschaften nachgewiesen (M. Tagashira et al., Biosci. Biotech. Biochem. 59, 740-742 (1995)). In der EP 5. 0 677 288 A2 werden außerdem pharmazeutische Zusammensetzungen zur Behandlung der Osteoporose beschrieben, die Verbindungen aus der Gruppe der α -Bittersäuren und der α -iso-Bittersäuren enthalten.

10. In den letzten Jahren wurden neben den α - und β -Bittersäuren (J. Kölz, Zeitschrift für Phytotherapie 13, 155-161 (1992)) verstärkt auch die phenolischen Inhaltsstoffe des Hopfens untersucht und es wurden neben dem schon länger bekannten Xanthohumol 1 zahlreiche weitere Verbindungen vom Flavontyp 15. in der Hopfenpflanze gefunden (J. F. Stevens et al., Phytochemistry 44, 1575-1585 (1997), J. F. Stevens et al., J. Chromat. A 832 (1-2), 97-107 (1999)). Es handelt sich hierbei in erster Linie um isoprenylierte Flavonolide wie z. B. 6- oder 8-Prenylnaringenin 2 und 3 sowie Isoxanthohumol 4.

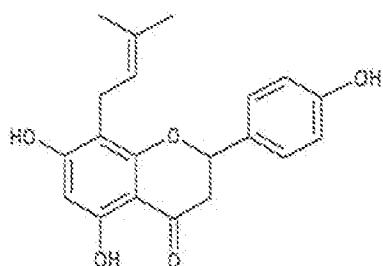
20. Stevens et al. (Phytochemistry 53, 759-775 (2000)) untersuchten auch die Chemotaxonomie von Hopfenarten und -taxa.



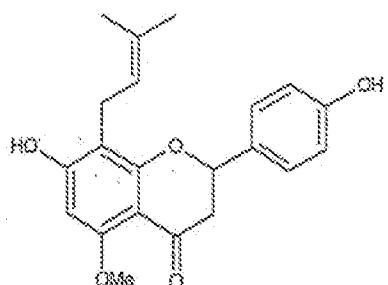
11



2



2



3

16 Immer wieder wurde beobachtet, dass bei Hopfenpflückerinnen
Menstruationsstörungen auftraten, die auf Östrogene
Substanzen im Hopfen zurückgeführt wurden, ohne dass diese
Effekte aber eindeutig einem oder mehreren Inhaltsstoffen
zugeordnet werden konnten. Inzwischen konnte diese Östrogene
Aktivität des Hopfens bestätigt werden. Dabei zeigte sich,
18 dass 8-Prenylnaringenin 3 im wesentlichen für diese Wirkungen
verantwortlich ist (S. R. Milligan et al., J. Clin.
Endocrinol. Metab. 84, 2249-2252 (1999)). Die in-vitro
Östrogene Aktivität dieser Verbindung zeigte sich an ihrer
relativen Bindungsaaffinität an Östrogenrezeptoren und wurde
insbesonders anhand der Stimulation der alkalischen
20 Phosphatase in Ishikawa-Var-I-Zellen getestet. Dabei zeigte
sich, dass 8-Prenylnaringenin wesentlich aktiver war als

bisher bekannte Phytoöstrogene wie Coumestrol, Genistein oder Daidzein, und nur wenig schwächer wirkte als 17 β -Östradiol. Milligan et al. (J.Endocrin.Metabol. 88, 4912-4915 (2000)) berichteten auch über die Bindung verschiedener phenolischer 5 Hopfeninhaltsstoffe an einen von Hefezellen exprimierten humanen Östrogenrezeptor. Dabei zeigte wiederum 8-Prenylnaringenin die stärkste östrogene Aktivität. Schwächere östrogene Eigenschaften zeigten 6-Prenylnaringenin, 6,8-Diprenylnaringenin und 8-Geranylningenin. Miyamoto et al. 10 (Planta Med. 64, 516-519 (1998)) konnten zeigen, dass 8-Prenylnaringenin das Uterusgewicht und die Knochendichte bei ovariectomierten Ratten normalisiert. Weiterhin wird in der JP 08 165238 (ref. CA 125:158632) die Östrogen-agonistische 15 Aktivität einer Reihe von 8-prenylierten Flavonderivaten, darunter auch 8-Prenylnaringenin, beschrieben.

In neueren Studien konnte nachgewiesen werden, dass einige Flavonoide des Hopfens, insbesondere Xanthohumol 1, auf den Stoffwechsel von Zellen einwirken können. Sie sind in der Lage, Enzymreaktionen, die bei der Entstehung von Tumorzellen eine wichtige Rolle spielen, positiv zu beeinflussen. Damit können diese Verbindungen als Krebspräventiva angesehen werden (Tagung der deutschen Gesellschaft für Hopfenforschung, Stand der Erkenntnisse zum Hopfeninhaltstoff Xanthohumol, 24. März 1998, Aschheim). Miranda et al. (Food Chem. Tox. 37(4), 271-285 (1999)) berichteten 20 über starke antiproliferative Aktivität von Xanthohumol 1 und Isoxanthohumol 4 an humanen MCF-7 Brustkrebszellen, sowie an HAT-29 Dickdarm- und A-2780 Ovar-Krebszelllinien.

36

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Xanthohumol 1 Knochenschwund hemmend beeinflusst. Seine Verwendung als Therapeutikum gegen Osteoporose ist in der EP 0 679 393 B1

beschrieben. Obwohl die Erfinder östrogene Eigenschaften von Xanthohumol postulieren, werden diese aber nicht demonstriert. Im Gegenteil schlossen S.R. Milligan et al. (Pharm. Pharmacol. Lett 7, 83-86 (1997)) eindeutig aus, dass die Osteoporose-hemmende Aktivität von Xanthohumol auf einer östrogenen Wirkung beruht, da sie entsprechende Aktivitäten weder an der humanen Endometrium-Karzinomzelllinie Ishikawa noch in einem Hefe-Reportergen-Assay (S.R. Milligan et al., J. Clin. Endocrinol. Metabol. 84, 2249-2252 (1999)) nachweisen konnten. Entgegen diesen Untersuchungen wird in der vorliegenden Erfindung demonstriert, dass Xanthohumol 1 und Isoxanthohumol 4 mit vergleichbarer Aktivität an die Östrogenrezeptoren alpha und beta binden.

15 Kumai und Okamoto (Toxicology Letters 21, 203-207 (1984)) berichteten über hochmolekulare Kohlehydratfraktionen aus rein wässrigen Hopfenextrakten, die bei mit PMS-Gonadotropin vorbehandelten jungen Ratten das Ovargewicht verringerten. Okamoto und Kumai (Acta Endocrinologica 127, 371-377 (1992)) bestätigten diese Befunde aufgrund der Beobachtung von erniedrigten 17 β -Östradiol- und LH-Blutspiegeln, verursacht durch Gabe von rein wässrigem Hopfenextrakt.

20 In der DE 199 39 350 A1 wird ein Hopfenextrakt mit einem erhöhten Xanthohumolgehalt beschrieben. Dieser Extrakt soll Bier sowie fruchtsafthaltigen Erfrischungsgetränken zugesetzt werden. Über die Anwesenheit von prenylierten Naringeninen in diesem Extrakt ist nichts bekannt. Gemäß dem Ausführungsbeispiel wird das Xanthohumol mit 50 Gew.-% Ethanol aus dem Hopfen extrahiert. Dies führt aber nicht zu einer optimalen Extraktion des Xanthohumols, da dies erst mit hochprozentigem Ethanol (>80% Gew.) mit hoher Wiederfindung in den Extrakt übergeht.

In der WO 83/00701 A1 wird ein Verfahren zur Gewinnung östrogenwirksamer Stoffe aus Hopfen beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass zunächst ein Kohlendioxid-Extrakt aus 5 Hopfen unter Zusatz von Wasser als Schleppmittel hergestellt wird und anschließend daraus die östrogenwirksamen Stoffe mittels Etherextraktion oder chromatographischer Verfahren erhalten werden. Ferner wird die Verwendung dieser Stoffe als Zusatz zu Puttermitteln, für kosmetische Mittel oder als 10 Badezusatz beansprucht. Über die Natur dieser östrogenwirksamen Stoffe werden keinerlei Angaben gemacht.

In der WO 01/30961 A1 wird ein Verfahren zur Gewinnung von stabilen Bierbrauzusätzen beansprucht, dadurch gekennzeichnet, dass der Hopfentreber-Rückstand der 15 Kohlendioxid-Extraktion mit einem polaren Lösungsmittel, vorzugsweise heißem Wasser, extrahiert wird, der Extrakt anschließend angesäuert, mit einem unpolaren Lösungsmittel, vorzugsweise Hexan, gewaschen und - ggf. nach Trocknung - als 20 Brauzusatz verwendet wird. Der übrigbleibende Treber wird verworfen.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Pflanzenextrakte bereitzustellen, die zur Herstellung von 25 Arzneimitteln zur Prophylaxe und Therapie von Krankheitszuständen geeignet sind, die durch einen Mangel an Östrogenen oder durch Dysregulationen des Geschlechtshormonstoffwechsels, insbesondere des Östrogenstoffwechsels, verursacht werden.

26

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung solcher Extrakte sowie diese

umfassende pharmazeutische Zubereitungen, die zur Behandlung der vorstehend genannten Krankheitszustände geeignet sind.

Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß durch den Hopfenextrakt s gemäß Patentanspruch 1 und 2, die Verfahren gemäß den Patentansprüchen 3-12, die pharmazeutische Zubereitung gemäß Patentanspruch 13 sowie die Verwendung der Extrakte oder der pharmazeutischen Zubereitung gemäß den Patentansprüchen 14-16 gelöst.

16

Die vorliegende Erfindung beruht unter anderem auf dem überraschenden Befund, dass aus Hopfendroge nach Entfernung von lipophilen und hydrophilen Ballaststoffen Extrakte erhalten werden, welche die phloroglucinolartigen is Hopfenbittersäuren nach wie vor enthalten, gleichzeitig freie und/oder gebundene Chalkone und Flavone wie Xanthohumol, Isoxanthohumol sowie 6- und 8-Prenylnaringenin dagegen in angereicherter Form enthalten. Insbesondere überraschend ist die Tatsache, dass der Gehalt an 6- und 8-Prenylnaringenin 26 von der Temperatur der Wasservorextraktion abhängt (s. Beispiel 3) und bis zu ca. einem Faktor 2 gesteigert werden kann.

Figur 1 veranschaulicht die Abhängigkeit der Konzentration 28 der analysierten Inhaltsstoffe von der Temperatur der Wasservorextraktion.

Ein solcher Extrakt kann durch ein- bis mehrmalige Extraktion mit einem C₅-C₇-Alkan oder mit überkritischem CO₂ 36 (Entfettungsstufe), nachfolgende Extraktion des verbleibenden Drogenrückstandes mit Wasser und daran anschließende Extraktion des übrig bleibenden Drogenrückstandes mit einem mittelpolaren Lösungsmittel ausgewählt aus der Gruppe

bestehend aus Alkoholen, wässrigen Alkoholen, Ketonen, wässrigen Ketonen, Estern und ggf. nachfolgende Flüssig-Flüssig-Verteilung erhalten werden. Überraschenderweise gehen die Hopfenbittersäuren nicht vollständig, sondern nur zu s einem Teil in den lipophilen Extrakt über, während auf der anderen Seite die Chalkone und Flavone bei der Wasseraufzehrung nahezu vollständig im Drogenrückstand verbleiben. Dadurch ist es möglich, einen Hopfenextrakt zu erhalten, der alle pharmakologisch relevanten Inhaltsstoffe 10 (Bittersäuren, Chalkone, Flavone) in einem ausgeglichenen Verhältnis enthält. Durch diese günstige Zusammensetzung aus mehreren therapeutischen Wirkprinzipien ist dieser Extrakt in idealer Weise bei Krankheitszuständen einsetzbar, die durch einen Mangel an Östrogenen oder durch andere hormonelle 15 Dysregulationen verursacht werden.

Die erfindungsgemäßen Hopfenextrakte sind zur Prophylaxe und Behandlung von mit dem Klimakterium oder der Postmenopause bei Frauen einhergehenden Beschwerden geeignet, wobei die 20 Symptome unter anderem Hitzewallungen, Depressionen, Angstzustände, geistige Verwirrtheit, Schlaflosigkeit sowie mit der Postmenopause zusammenhängende ernsthafte Gesundheitsprobleme wie Osteoporose, Herz-Kreislauf- 25 erkrankungen, Schlaganfall, Demenz und Tumorerkrankungen umfassen. Andere Erkrankungen, die auf einer Dysregulation des Geschlechtshormonstoffwechsels beruhen und mit dem erfindungsgemäßen Extrakt behandelt werden können, sind z.B. Amenorrhöe, anovulatorische Zyklen, Menometrorragie, 30 premenstruelle Beschwerden und postpartale Depressionen. Desgleichen können diese Extrakte zur Behandlung Geschlechtshormon-abhängiger Krankheiten beim Mann verwendet werden, wie z.B. der benignen Prostatahyperplasie oder dem Prostatakarzinom.

Die überraschend hohe Östrogene Aktivität der erfindungsgemäßen Hopfenextrakte wurde sowohl mit einem kompetitiven Rezeptorbindungsassay für die humanen Östrogenrezeptoren alpha und beta als auch in einem rekombinanten Hefe-Assay im Vergleich zur Aktivität von 17 β -Östradiol nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigen herkömmliche Standard-Hopfenextrakte bei gleicher Dosierung wesentlich schwächere oder keinerlei Aktivität.

10

Figur 2 zeigt die Aktivität eines Vergleichsextraktes und zweier erfindungsgemäßer Hopfenextrakte in einem Hefe-Reportergenassay.

15

Erfindungsgemäß wird ein Hopfenextrakt mit einem gegenüber herkömmlichen, insbesondere wässrig-alkoholischen Extracten erhöhtem Gehalt an freien und/oder gebundenen Chalkonen und Flavonen, insbesondere 6- und 8-Prenylnaringenin, Xanthohumol und Isoxanthohumol bereitgestellt, der gleichzeitig noch α- und eventuell β-Bittersäuren (Humulon bzw. Lupulon und dessen Derivate) enthält.

25

Weiter wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur Herstellung dieser Hopfenextrakte bereitgestellt, umfassend die Schritte:

20

- (a) ein- oder mehrmaliges Extrahieren einer Hopfendroge mit einem C₅-C₇-Alkan oder überkritischem CO₂ und Abtrennen des Drogenrückstandes von der Extraktionslösung;
- (b) ein- oder mehrmaliges Extrahieren des Drogenrückstandes aus Schritt (a) mit Wasser und Abtrennen des Drogenrückstandes;

(c) ein- oder mehrmaliges Extrahieren des Drogenrückstandes aus Schritt (b) mit einem Lösungsmittel ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Alkoholen, wässrigen Alkoholen, Ketonen, wässrigen Ketonen und Estern sowie Filtrieren der erhaltenen Extraktionslösung; und

5 (d) Entfernen des Lösungsmittels aus den in Schritt (c) erhaltenen vereinigten Extraktlösungen und Trocknen des erhaltenen Rückstands.

10 Das Verhältnis Droge zu Lösungsmittel liegt bei jedem Extraktionsschritt im Bereich von etwa 1 : 7 bis etwa 1 : 12.

15 Die Extraktion mit einem C₅-C₇-Alkan oder überkritischem CO₂ in Schritt (a) wird vorzugsweise ein-, zwei- oder dreimal, insbesondere dreimal, durchgeführt.

20 Die Extraktion mit überkritischem CO₂ ist besonders bevorzugt.

25 Das C₅-C₇-Alkan in Schritt (a) ist vorzugsweise ein C₅-C₇-n-Alkan aus der Gruppe bestehend aus n-Pentan, n-Hexan und n-Heptan, wobei n-Heptan ganz besonders bevorzugt ist.

30 Die Extraktion in Schritt (b) wird vorzugsweise bei einer Temperatur zwischen 60 und 95°C, vorzugsweise bei 90°C, durchgeführt wobei die Extraktionsdauer eine oder mehrere Stunden betragen kann.

35 Das Lösungsmittel in Schritt (c) ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ethanol, wässrigem Ethanol, Methanol, wässrigem Methanol, Aceton, wässrigem Aceton und Ethylacetat, wobei 80 bis 96% (g/g) Ethanol, 74 bis 99% (g/g)

Methanol bzw. 60 bis 99% (g/g) Aceton bevorzugt ist und 92% (g/g) Ethanol besonders bevorzugt ist.

Der erfundungsgemäße Hopfen(trocken)extrakt ist gekennzeichnet durch einen Gehalt an α -Bittersäuren von mindestens 0,5%, vorzugsweise mindestens 0,8% und insbesondere mindestens 1%, an Xanthohumol von mindestens 2%, vorzugsweise mindestens 3% und insbesondere mindestens 4% und an prenylierten Flavonen von mindestens 0,5%, vorzugsweise mindestens 0,7%. Die prenylierten Flavone umfassen vorzugsweise 6-Prenylnaringenin, 8-Prenylnaringenin und Isoxanthohumol. Xanthohumol ist im Sinne der vorliegenden Erfindung nicht zu den prenylierten Flavonen zu zählen. Die Prozentangaben beziehen sich auf das Gewicht des Hopfentrockenextraktes.

Die erhaltenen Extrakte können zusammen mit üblichen pharmazeutisch verträglichen Hilfsstoffen zu pharmazeutischen Zubereitungen wie Kapseln, Filmtabletten und Dragees verarbeitet werden. Als pharmazeutische Hilfsstoffe werden übliche Füll-, Binde-, Sprang-, Schmier- und Überzugsmittel für Filmtabletten und Dragees sowie Öle und Fette als Füllmassen für Weichgelatinekapseln verwendet.

Die erfundungsgemäßen Extrakte können zur Prophylaxe und Therapie von Krankheitszuständen verwendet werden, die durch einen Mangel an Östrogenen oder durch andere hormonelle Dysregulationen verursacht werden, wie insbesondere klimakterische Beschwerden, geschlechtshormonabhängige Krebserkrankungen, benigne Prostatahyperplasie, Osteoporose, Alzheimerische Krankheit und Herz-Kreislauferkrankungen. Im Falle der geschlechtshormonabhängigen Krebserkrankungen können die erfundungsgemäßen Extrakte insbesondere zur

Prophylaxe und Therapie von Brustkrebs, Gebärmutterkrebs und Prostatakrebs verwendet werden.

Die Dosierung der erfindungsgemäßen Extrakte liegt im Bereich von 0.005 g bis 2 g Extrakt 1 bis 4 mal täglich, vorzugsweise im Bereich von 0.02 g bis 1 g 1 bis 2 mal täglich. Die Dosierung im Einzelfalle ist abhängig vom Krankheitsbild und den individuellen Umständen des Patienten und kann von dem behandelnden Fachmann entsprechend den jeweiligen Bedürfnissen angepasst werden.

Die nachstehend angegebenen Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht beschränkend aufzufassen. Alle Prozentangaben beziehen sich auf das Gewicht, falls nichts anders angegeben ist.

Vergleichsbeispiel: Herstellung eines 96% (g/g) Ethanolextraktes ohne vorherige Entfettung

50 g der Hopfendroge (Sorte "Hallertauer Magnum") wurden mit 500 g 96% (g/g) Ethanol versetzt und mit dem Ultraturrax zerkleinert. Es wurde 1 h bei 60°C extrahiert. Anschließend wurde über einen Seitz 1500 Filter filtriert. Die Droge wurde noch weitere 2 Male auf dieselbe Weise extrahiert. Die vereinigten Extraktlösungen wurden am Rotationsverdampfer vom Ethanol befreit und über Nacht im Vakuumtrockenschrank bei 50°C getrocknet. Aus der Trockenmasse wird der Gehalt an charakteristischen Inhaltsstoffen per nachstehender HPLC-Methode ermittelt. Diese HPLC-Methode wird zur Bestimmung der Inhaltsstoffe auch bei den weiteren Beispielen angewendet.

säule	LiChrospher 100 5 μ m, 250 x 4 mm
Eluens	A: 1000 ml bidest Wasser/ 3 ml Phosphorsäure (85%) / 2 ml Triethylamin B: 1000 ml Acetonitril / 3 ml Phosphorsäure (85%) / 2 ml Triethylamin / 60 ml bidest Wasser
Gradient	40% B auf 70% B in 30 min; 70% B auf 100% B in 10 min
Fluß	1,2 ml/min
Detektion	Diodenarray

Ausbeute (96% (g/g) Ethanol-Extrakt): 18,36 g => 36,6%

8

HPLC-Gehalt an Hopfen α -Bittersäuren: 19,8%

HPLC-Gehalt an Hopfen β -Bittersäuren: 4,2%

HPLC-Gehalt an Xanthohumol: 1,3%

10 HPLC-Gehalt an 6- und 8-Fenylnaringeninen,
sowie an Isoxanthohumol: unterhalb der Nach-
weisgrenze (< 0,01%)

15 Beispiel 1a: Herstellung eines Hopfenextraktes (Extaktion mit CO_2 und anschließend Wasservorextraktion bei 90°C)

Serielle Extraktion mit überkritischem CO_2 , Wasser und 93% (g/g) Ethanol:

20 80,6 g einer Hopfendroge (Sorte „Hallertauer Magnum“), die zuvor mit überkritischem CO_2 vorextrahiert worden war (Bedingungen: Vermahlung auf 10 mm Korngröße, Extraktion mit CO_2 bei 250 bar/50°C, Abtrennung des Extraktes mit einer Ausbeute von 30%), wurden mit 960 g Wasser zunächst 5 Min. am 25 Ultra-Turrax, dann unter Rühren 1 Stunde bei 90°C extrahiert.

Anschließend wurde der Wasserextrakt über ein Seitz Supra Filter 1500 abfiltriert. Der noch leicht feuchte Drogenrückstand wurde dann mit je 2 mal 800 g 92% (g/g) Ethanol jeweils 1 Stunde bei 60°C extrahiert. Es wurde dann 5 über Seitz Supra 1500 abfiltriert und die Extraktlösung am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 55-65°C von Ethanol befreit und im Trockenschrank bei 60°C getrocknet.

16 Ausbeuten:

Rückstand aus Wasserextraktion: 18,96 g (23,5%)

Rückstand aus 92% (g/g) EtOH-Extraktion: 9,83 g (12,3%)

HPLC-Gehalte (bezogen auf den 92% (g/g) EtOH-Extrakt):

HPLC-Gehalt an Hopfen α -Bittersäuren: 2%

17 HPLC-Gehalt an Hopfen β -Bittersäuren: 0,5%

HPLC-Gehalt an Xanthohumol 5,83%

HPLC-Gehalt an 6-Prenylnaringenin 0,63%

HPLC-Gehalt an 8-Prenylnaringenin 0,21%

HPLC-Gehalt an Isoxanthohumol 0,42%

20

Beispiel 1b: Herstellung eines Hopfenextraktes (Extraktion mit CO_2 und anschließend Wasservorextraktion bei 90°C)

25 Serielle Extraktion mit überkritischem CO_2 , Wasser und 92% (g/g) Ethanol:

504,26 g einer Hopfendroge (Sorte „Hallertauer Magnum“), die zuvor mit überkritischem CO_2 vorextrahiert worden war (Bedingungen: Vermahlung auf 10 mm Korngröße, Extraktion mit 30 CO_2 bei 250 bar/50°C, Abtrennung des Extraktes mit einer Ausbeute von 30%), wurden mit 6 kg Wasser zunächst 5 Min. am Ultra-Turrax, dann unter Rühren 1 Stunde bei 90°C extrahiert. Anschließend wurde der Wasserestrakt über ein Seitz Supra

Filter 1500 abfiltriert. Der noch leicht feuchte Brogenrückstand wurde dann mit je 2 mal 5 kg 92% (g/g) Ethanol jeweils 1 Stunde bei 60°C extrahiert. Es wurde dann über Seitz Supra 1500 abfiltriert und die Extraktlösung am s. Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 55-65°C von Ethanol befreit und im Trockenschrank bei 60°C getrocknet.

Ausbeuten:

10 Rückstand aus Wasserextraktion: 105,9 g (21%)
Rückstand aus 92% (g/g) EtOH-Extraktion: 69,37 g (13,8%)
HPLC-Gehalte (bezogen auf den 92% (g/g) EtOH-Extrakt):
HPLC-Gehalt an Hopfen α -Bittersäuren: 1%
HPLC-Gehalt an Hopfen β -Bittersäuren: 0,5%
15 HPLC-Gehalt an Xanthchumol 4,41%
HPLC-Gehalt an 6-Prenylnaringenin 0,49%
HPLC-Gehalt an 8-Prenylnaringenin 0,15%
HPLC-Gehalt an Isoxanthchumol 0,6%

20

Beispiel 2: Herstellung eines Hopfenextraktes (Extraktion mit CO₂ und anschließend Wasservorextraktion bei 60°C)

25 Serielle Extraktion mit überkritischem CO₂, Wasser und 92% (g/g) Ethanol:

30 80,36 g einer Hopfendrogs (Sorte „Hallertauer Magnum“), die zuvor mit überkritischem CO₂ vorextrahiert worden war (Bedingungen: Vermahlung auf 10 mm Korngröße, Extraktion mit CO₂ bei 250 bar/50°C, Abtrennung des Extraktes mit einer Ausbeute von 30%), wurden mit 964 g Wasser zunächst 5 Min. am Ultra-Turrax, dann unter Rühren 1 Stunde bei 60°C extrahiert. Anschließend wurde der Wasserextrakt über ein Seitz Supra

Filter 1500 abfiltriert. Der noch leicht feuchte Drogenrückstand wurde dann mit je 2 mal 600 g 92% (g/g) Ethanol zunächst 5 Min. am Ultra-Turrax, dann unter Rühren jeweils 1 Stunde bei 60°C extrahiert. Es wurde dann über s. Seitz Supra 1500 abfiltriert und die Extraktlösung am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 55-65°C von Ethanol befreit und im Trockenschrank bei 60°C getrocknet.

10 Ausbeuten:

Rückstand aus Wasserextraktion: 17,91 g (22%)

Rückstand aus 92% (g/g) EtOH-Extraktion: 9,95 g (12,4%)

HPLC-Gehalte (bezogen auf den 92% (g/g) EtOH-Extrakt):

HPLC-Gehalt an Hopfen α -Bittersäuren: 1,58%

15 HPLC-Gehalt an Hopfen β -Bittersäuren: 0%

HPLC-Gehalt an Xanthohumol 6,1%

HPLC-Gehalt an 6-Prenylnaringenin 0,4%

HPLC-Gehalt an 8-Prenylnaringenin 0,09%

HPLC-Gehalt an Isoxanthohumol 0,21%

20

Beispiel 3: Herstellung eines Hopfenextraktes (Extraktion mit n-Heptan und anschließend Wasser bei 90°C)

25 247,6 g Hopfendroge (Sorte „Hallertauer Magnum“) wurden mit dem 7-fachen Gewicht zunächst 5 Min. am Ultra-Turrax, dann unter Rühren 1 Stunde mit n-Heptan extrahiert. Nach Abfiltrieren der heptanischen Extraktlösung über Seitz Supra 1500 wurde noch ein zweites Mal in der gleichen Weise extrahiert. Danach wurde der erhaltende Drogenrückstand im Vakuumtrockenschrank vom Heptan befreit. Der trockene Drogenrückstand (205 g) wurde sodann mit der 12-fachen Gewichtsmenge Wasser versetzt und während 1 Stunde bei 90°C

gehalten. Danach wurde erneut abfiltriert und der noch leicht feuchte Drogenrückstand mit der 10-fachen Gewichtsmenge 92% (g/g) Ethanol unter Röhren zweimal bei 60°C extrahiert. Es wurde dann über Seitz Supra 1500 abfiltriert und die Extraktlösung am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 55-65°C von Ethanol befreit und im Trockenschrank bei 60°C getrocknet.

Ausbeuten:

Heptanextrakt: 26,4 g (10,7%)
Wasserextrakt: 41,1 g (16,6%)
92% (g/g) Ethanolextrakt: 52,0 g (21,0%)
HPLC-Gehalte (bezogen auf den 92% (g/g) EtOH-Extrakt):
alpha-Bittersäuren: 0,86%
beta-Bittersäuren: 0,05%
Xanthohumol: 3,3%
6-Prenylnaringenin: 0,45%
8-Prenylnaringenin: 0,13%
Isoxanthohumol: 0,25%

20

Beispiel 4: Abhängigkeit des Gehaltes an 6-Prenyl-, 8-Prenylnaringenin und Isoxanthohumol von der Temperatur der Wasservorextraktion

25

Extraktion: Ca. 80 g einer mit CO₂ vorextrahierten Hopfendroge wurden mit dem 12-fachen Gewicht an Wasser zunächst 5 Min. am Ultra-Turrax, dann unter Röhren 1 Stunde bei 60, 70, 80, 90 und 95°C extrahiert. Anschließend wurde der Wasserextrakt über ein Seitz Supra Filter 1500 abfiltriert. Der noch leicht feuchte Drogenrückstand wurde dann mit je 2 mal 800 g 92% (g/g) Ethanol zunächst 5 Min. am Ultra-Turrax, dann unter Röhren jeweils 1 Stunde bei 60°C

extrahiert. Es wurde dann über Seitz Supra 1500 abfiltriert und die Extraktlösung am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 55-65°C von Ethanol befreit und im Trockenschrank bei 60°C getrocknet.

5

Die in der Figur 1 graphisch dargestellten Ergebnisse zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Konzentration der analysierten prenylierten Inhaltsstoffe von der Temperatur der Wasservorextraktion.

10

Beispiel 5: Prüfung der Hopfenextrakte auf Östrogene Aktivität

15 Zur Prüfung von individuellen Extraktinhaltsstoffen, einem Vergleichsextrakt und einem erfindungsgemäßen Extrakt auf Wechselwirkungen mit dem humanen Östrogenrezeptor alpha (ER-
α) bzw. beta (ER-β) wurde ein kompetitiver
20 Rezeptorbindungsassay durchgeführt. Dabei wird zunächst radioaktiv markiertes Östradiol an den humanen Östrogenrezeptor gebunden und anschließend mit der zu untersuchenden Testsubstanz behandelt. Ein der östrogenen Potenz der Probe entsprechender Anteil an markiertem Östradiol wird dabei verdrängt. Überschüssiges Östradiol wird
25 nach Bindung des Komplexes an Hydroxylapatit herausgewaschen. Die Östrogenrezeptor ER-α und ER-β wurden käuflich als rekombinante humane Rezeptoren erworben. Die Testansätze bestanden jeweils aus 1000 µl TEDG-Puffer (10 mM Tris, 1.5 mM EDTA, 10% Glycerol, pH 7,5), 5 µl Rezeptor (200 nM), 10 µl
30 ³H-Östradiol und 10 µl Ethanol (Kontrollwert), 10 µl Diethylstilöstrol (100 mM, Positivkontrolle) oder 10 µl Extrakt bzw. Extraktinhaltsstoff. Die Ansätze werden vorsichtig durchmischt und für ca. 16 Stunden bei

Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wird 250 μ l Hydroxylapatit (HAP) zugesetzt, um die Proteine zu adsorbieren. Während einer Inkubationsphase von 15 Minuten werden die Ansätze alle fünf Minuten mit der Hand s durchmischt. Der Niederschlag wird bei 10.000 rpm für einige Sekunden scharf abzentrifugiert und der Überstand wird abpipettiert. Das Pallet wird dreimal mit je 1000 μ l TEGP Puffer gewaschen und zur Messung mit 1000 μ l Ethanol 10 versetzt, aufgeschlämmt und in ein Szintillationsvial 16 überführt. Nach Zugabe von 9 ml Szintillatorflüssigkeit (Ready Safe, Beckmann) erfolgt eine Messung über das gesamte ^{3}H -Fenster in einem Beckmann Beta-Counter.

Die Charakterisierung der Bindungskapazitäten der 15 Testsubstanzen erfolgt über die Bestimmung der ED₅₀-Werte aus den Dosis-Wirkungskurven der Östradiolverdrängung. Die Ergebnisse sind in der Tab. 1 zusammengestellt und demonstrieren für alle untersuchten Inhaltsstoffe potente Wechselwirkungen mit beiden Östrogenrezeptoren. 20 Überraschenderweise erwies sich der erfindungsgemäße Extrakt als wesentlich stärker wirksam als anhand der Aktivitäten der einzelnen Inhaltsstoffe zu erwarten wäre. Im Gegensatz dazu zeigte der Vergleichsextrakt eine Aktivität an beiden Rezeptoren, die mindestens 10fach unterhalb der des 25 erfindungsgemäßen Extraktes lag.

Tab. 1: Bindung von Extraktinhaltsstoffen, einem erfindungsgemäßen Extrakt und einem Vergleichsextrakt an den 30 humanen Östrogenrezeptor-alpha (ER- α) bzw. Östrogenrezeptor-beta (ER- β)

Substanz	ED ₅₀ [pg/ml]		Relative Potenz		Rel. Potenz ER- α Rel. Potenz ER- β
	ER- α	ER- β	ER- α	ER- β	
17 β -Östradiol	507	400	1	1	1
8-Prenylnaringenin	4.6x10 ⁴	1.0x10 ³	1.1x10 ⁻²	4.0x10 ⁻³	2.72
6-Prenylnaringenin	1.6x10 ⁴	4.6x10 ³	3.2x10 ⁻³	8.7x10 ⁻⁴	0.37
Isoxanthohumol	2.0x10 ⁴	8.5x10 ³	2.5x10 ⁻⁴	4.7x10 ⁻⁴	0.54
Xanthohumol	2.0x10 ⁴	1.2x10 ³	2.3x10 ⁻⁴	3.3x10 ⁻⁴	0.78
Erfindungsgemäßer Extrakt	3.9x10 ⁵	2.7x10 ³	1.3x10 ⁻³	1.5x10 ⁻³	0.87
Vergleichsextrakt	4.0x10 ⁵	4.3x10 ³	1.3x10 ⁻⁴	9.4x10 ⁻⁴	1.33

Die Prüfung von Extrakten auf Östrogene Eigenschaften erfolgte außerdem mit einem Reportergen-Assay unter Verwendung von Hefezellen (*Saccharomyces*). Die Zellen sind stabil mit dem humanen α -Östrogenrezeptor und einem Expressionsplasmid, das ein Östrogenresponse-Element und das Gen für das Enzym β -Galaktosidase enthält, transfiziert. Alle Proben wurden in einer Konzentration von 20 mg/ml in DMSO gelöst und unverdünnt oder nach Verdünnen mit DMSO im Verhältnis 1/10, 1/100 oder 1/1000 in einem Volumen von 1 μ l zu 100 μ l Kulturmedium in 96-Well Flachboden-Mikrotiterplatten gegeben. Anschließend wurden 100 μ l Hefesuspension und das chromogene Substrat Chlorphenolrot- β -D-Galactopyranosid zugefügt. Auf jeder Platte wurden zur Kontrolle Wells vorbereitet, in die nur Kulturmedium bzw. das Lösungsmittel eingesfüllt wurde oder die die Standardkonzentrationen von 17 β -Östradiol enthielten. Die Hefezellen wurden 72 h bei 32°C inkubiert und dann wurde die Absorption des Mediums bei 540 nm in einem Mikrotitierplatten-Photometer gemessen. Die Proben wurden teilweise zweifach geprüft.

Ergebnisse:

Probe	Aktivität
96% (g/g) Ethanol-Extrakt gemäß Vergleichsbeispiel	inaktiv
92% (g/g) Ethanol-Extrakt gemäß Beispiel 1a	aktiv
92% (g/g) Ethanol-Extrakt gemäß Beispiel 2	aktiv

s Die Ergebnisse des Assays sind in Figur 2 dargestellt. Als "aktiv" werden hierbei jene Extrakte bezeichnet, deren Aktivität im Vergleich zur 17β -Östradiol-Standardkurve signifikant oberhalb der Background-Werte (entspricht etwa 10% der maximalen Stimulation) lag.

PATENTANSPRÜCHE

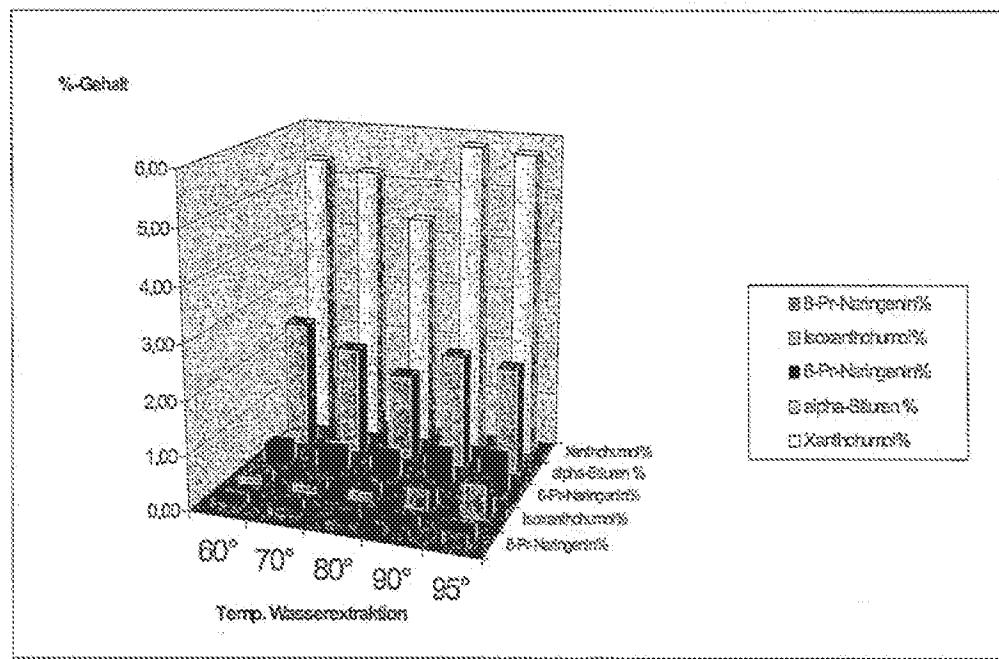
1. Hopfenextrakt, gekennzeichnet durch einen Gehalt an α -Bittersäuren von mindestens 0,5%, an Xanthohumol von mindestens 2% und an prenylierten Flavonen ausgewählt aus der Gruppe umfassend 6-Prenylnaringenin, 8-Prenylnaringenin und Isoxanthohumol von mindestens 0,5%.
2. Hopfenextrakt nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen Gehalt an α -Bittersäuren von mindestens 0,8%, an Xanthohumol von mindestens 3% und an prenylierten Flavonen ausgewählt aus der Gruppe umfassend 6-Prenylnaringenin, 8-Prenylnaringenin und Isoxanthohumol von mindestens 0,7%.
3. Verfahren zur Gewinnung eines Hopfenextrakts, umfassend die Schritte:
 - (a) ein- oder mehrmaliges Extrahieren einer Hopfendroge mit einem C₅-C₇-Alkan oder überkritischem CO₂ und Abtrennen des Drogenrückstandes von der Extraktionslösung;
 - (b) ein- oder mehrmaliges Extrahieren des Drogenrückstandes aus Schritt (a) mit Wasser und Abtrennen des Drogenrückstandes;
 - (c) ein- oder mehrmaliges Extrahieren des Drogenrückstandes aus Schritt (b) mit einem Lösungsmittel ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Alkoholen, wässrigen Alkoholen, Ketonen, wässrigen Ketonen und Estern sowie Filtrieren der erhaltenen Extraktionslösung; und
 - (d) Entfernen des Lösungsmittels aus den in Schritt (c) erhaltenen vereinigten Extraktlösungen und Trocknen des erhaltenen Rückstands.

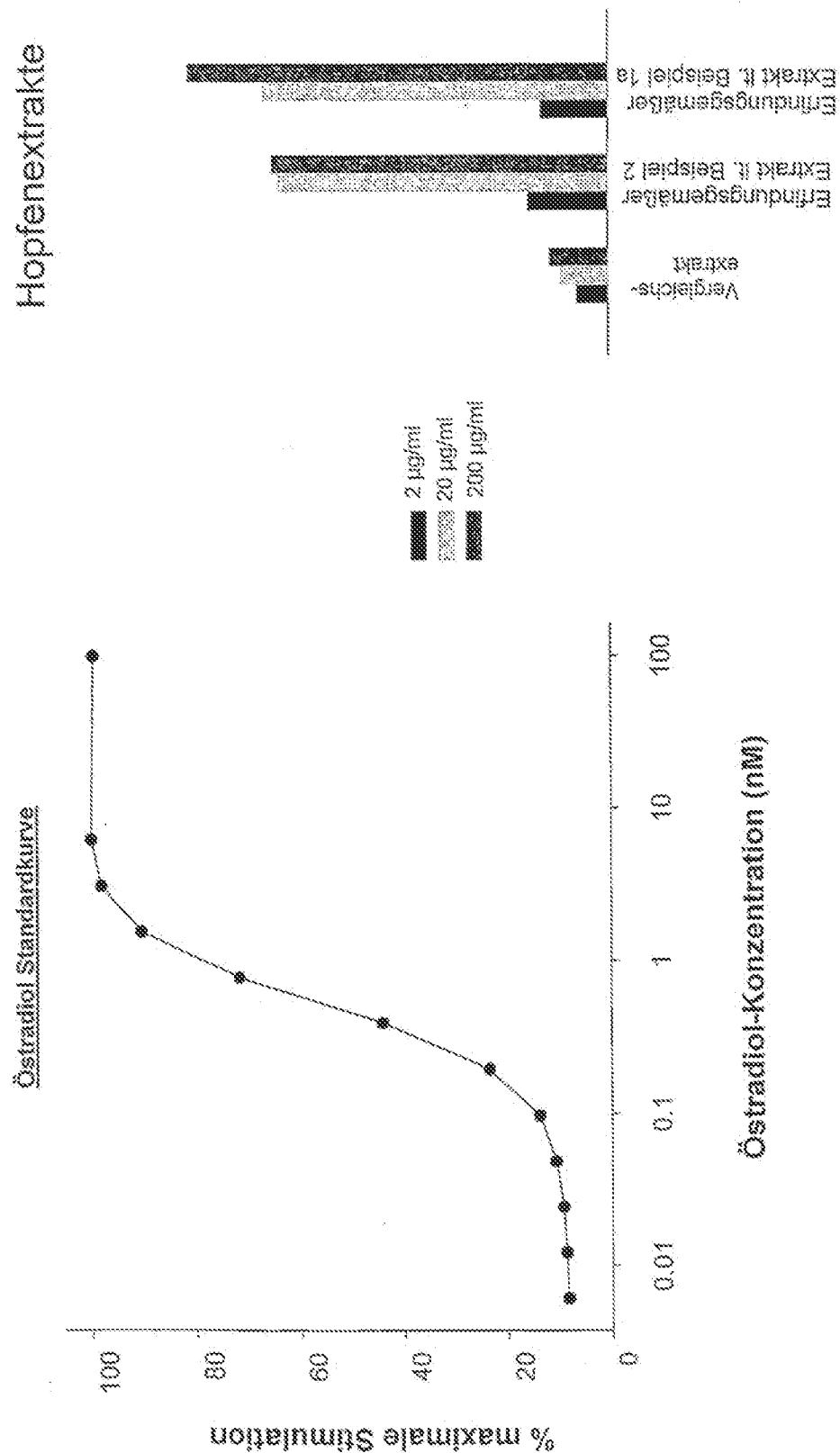
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei in Schritt (a) ein-, zwei- oder dreimal extrahiert wird.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 oder 4, wobei das Lösungsmittel in Schritt (a) ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus n-Pentan, n-Hexan und n-Heptan.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei das Lösungsmittel in Schritt (a) n-Heptan ist.
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 6, wobei die Extraktion in Schritt (b) zwischen 60 und 95°C, vorzugsweise bei etwa 90°C erfolgt.
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7, wobei das Lösungsmittel in Schritt (c) ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Methanol, wässrigem Methanol, Ethanol, wässrigem Ethanol, Aceton, wässrigem Aceton und Ethylacetat.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8, wobei das Lösungsmittel in Schritt (c) ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 80-96% (g/g) Ethanol, 74-99% (g/g) Methanol und 60-99% (g/g) Aceton.
10. Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9, wobei das Lösungsmittel in Schritt (c) 92% (g/g) Ethanol ist.
11. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Lösungsmittel in Schritt (a) n-Heptan ist und das Lösungsmittel in Schritt (c) 92% (g/g) Ethanol ist.

12. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Lösungsmittel in Schritt (a) überkritisches CO₂ ist und das Lösungsmittel in Schritt (c) 92% (g/g) Ethanol ist.
13. Pharmazeutische Zubereitung, umfassend einen Extrakt gemäß Anspruch 1 oder 2 und übliche pharmazeutische verträgliche Hilfsstoffe.
14. Verwendung eines Extrakts nach Anspruch 1 oder 2 oder einer pharmazeutischen Zubereitung nach Anspruch 13 zur Prophylaxe und Therapie von Krankheitszuständen, die durch einen Mangel an Östrogenen oder durch eine Dysregulation des Geschlechtshormonstoffwechsels, insbesondere Östrogenstoffwechsels verursacht werden.
15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei die Krankheitszustände aus der Gruppe bestehend aus klimakterischen Beschwerden, geschlechtshormonabhängigen Krebserkrankungen, benigner Prostatahyperplasie, Osteoporose, Alzheimerscher Krankheit und Herz-Kreislauferkrankungen ausgewählt sind.
16. Verwendung nach Anspruch 15, wobei die geschlechtshormonabhängigen Krebserkrankungen aus der Gruppe bestehend aus Brustkrebs, Prostatakrebs und Gebärmutterkrebs ausgewählt sind.

1/2

FIGUR 1





FIGUR 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/08943A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12C3/08 C12C3/10 A61K35/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, FSTA, BIOSIS, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ^a	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 199 39 350 A (PLANEXTRAKT GMBH & CO KG) 22 February 2001 (2001-02-22) cited in the application the whole document	1-4, 7-10, 12-16 5, 6, 11
X	US 5 972 411 A (SCHULZE WILLIAM G ET AL) 26 October 1999 (1999-10-26) column 12, line 39-64	1, 2
X	US 4 490 405 A (HARTL ALFONS ET AL) 28 December 1984 (1984-12-25) examples 4, 6	1, 2
Y	US 3 891 781 A (BAUER KURT ET AL) 24 June 1975 (1975-06-24) column 5, line 37-57	5, 6, 11
	-----	-----

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.^a Special categories of cited documents:

- *X document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *Y document but published on or after the International filing date
- *C document which may throw doubts on priority (claim) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *D document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *E document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

*T later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but used to understand the principle or theory underlying this invention

*W document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

*V document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

*G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search	Date of mailing of the International search report
15 October 2002	31/10/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 8838 Potsdamer Str. 83 - 22880 Hamburg Tel. (+49-70) 340-20940; Te. 31 891 800 08 Fax. (+49-70) 340-50018	Authorized officer Koch, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Invention Application No.

PCT/EP 02/08943

C. (Continued) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MIRANDA ET AL.: "Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (<i>Humulus lupulus</i>) in human cancer cell lines" FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, vol. 37, no. 4, 1999, pages 271-285, XP002216477 abstract -----	14-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP02/08943

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
See supplemental sheet further data PCT/ISA/210
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest



The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
EP02/08943

Continuation of I.1

Although Claims 14-16 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

Continuation of I.1

PCT Rule 39.1(iv) – method for treatment of the human or animal body by therapy.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No:

PCT/EP 02/08943

Patient document cited in search report		Publication date		Patient family member(s)		Publication date
DE 19939350	A	22-02-2001	DE	19939350 A1		22-02-2001
US 5972411	A	26-10-1999	AU	733954 B2		31-05-2001
			AU	6795098 A		22-10-1998
			BR	9807919 A		22-02-2000
			EP	0975736 A1		02-02-2000
			NZ	338078 A		26-10-2001
			WO	9844087 A1		08-10-1998
US 4490405	A	25-12-1984	DE	3103617 A1		05-08-1982
			AT	13556 T		15-06-1985
			DE	3263815 D1		04-07-1985
			EP	0057438 A2		11-08-1982
US 3891781	A	24-06-1975	DE	2244065 A1		14-03-1974
			AT	335950 B		12-04-1977
			AT	772473 A		15-08-1976
			AU	475885 B		02-09-1976
			AU	6015973 A		13-03-1975
			BE	804533 A1		06-03-1974
			CA	1014876 A1		02-08-1977
			CS	168671 B2		29-06-1976
			DD	11D051 A5		05-12-1974
			FR	2198994 A1		05-04-1974
			GB	1410450 A		15-10-1975
			JP	49066896 A		28-06-1974
			JP	57022548 B		13-05-1982

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Anmeldenachrichten

PCT/EP 02/08943

A. KLASSEINWEISUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12C3/08 C12C3/10 A61K35/78

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der EPO:

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Meldespatente (Klassifikationssystem und Klassifikationszeichen):
IPK 7 C12C

Recherchemente über nicht zum Meldespatenten gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen:

Während der internationalen Recherche eingeschlossene elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe):

EPO-Internal, WPI-Data, PAJ, FSTA, BIOSIS, COMPENDEX

C. ALS WESENTLICH ANGEGENENDE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Bezug auf kommanden Teil	Betr. Ansprech Nr.
X	DE 199 39 350 A (PLANTEXTRAKT GMBH & CO KG) 22. Februar 2001 (2001-02-22) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-4, 7-10, 12-16 5,6,11
X	US 5 972 411 A (SCHULZE WILLIAM G ET AL) 26. Oktober 1999 (1999-10-26) Spalte 12, Zeile 39-64	1,2
X	US 4 490 405 A (HARTL ALFONS ET AL) 25. Dezember 1984 (1984-12-25) Beispiele 4,6	1,2
X	US 3 891 781 A (BAUER KURT ET AL) 24. Juni 1975 (1975-06-24) Spalte 5, Zeile 37-57	5,6,11
		----/----

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:
- *' Veröffentlichung, die den aktuellsten Stand der Technik definiert, aber nicht als besonderes bedeutsam anzusehen ist
- *'' Steriles Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalem Anmeldedatum veröffentlicht werden ist
- *''' Veröffentlichung, die gezeigt ist, einen Praktikanspruch zweckmäßig er-scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungssystem einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen beweisenden Grund angegeben ist (siehe aussteller)
- *''' Veröffentlichung, die sich auf eine militärische Offenkundigkeit, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *'''' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *'''* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalem Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und in der Anmeldung nicht belegt, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der für zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *''''* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beispielhaft Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung, nicht als neu oder auf erheblichster Tatsigkeit beruhend betrachtet werden
- *'''''' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beispielhaft Erfindung kann nicht als auf erheblicher Tatsigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Veröffentlichung für einen Fachmann hinfällig ist
- *''''''* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Aussendatum des Internationalen Recherchenberichts
15. Oktober 2002	31/10/2002
Name und Postanschrift der internationalen Recherchebehörde Europäisches Patentamt, P.O. 3018, Patentamt 2 D-2220 F.R. Potsdam Tel. (031-70) 2940-2940, Telex 651 epo nl Fax. (031-70) 390-3018	Bewilligter Bediensteter Koch, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/08943

C (Fortsetzung) ALS WEGENTLICH ANGEBEHNE UNTERRAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beh. Anspruch Nr.
A:	MIRANDA ET AL.: "Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (<i>Humulus lupulus</i>) in human cancer cell lines" FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, Bd. 37, Nr. 4, 1999, Seiten 271-285, XP002216477 Zusammenfassung -----	14-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/08943

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(3a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. _____ weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. Ansprüche Nr. _____ weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. _____ weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) erfaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/SAV 210
<p>Fortsetzung von Feld I.1</p> <p>Obwohl die Ansprüche 14-16 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.</p> <p>-----</p> <p>Fortsetzung von Feld I.1</p> <p>Regel 39.1(iv) PCT - Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Patentdokument
PCT/EP 02/08943

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 19939350	A	22-02-2001	DE	19939350 A1		22-02-2001
US 5972411	A	26-10-1999	AU	733954 B2		31-05-2001
			AU	6795098 A		22-10-1998
			BR	9807919 A		22-02-2000
			EP	0975736 A1		02-02-2000
			NZ	338078 A		26-10-2001
			WO	9844087 A1		08-10-1998
US 4490405	A	25-12-1984	DE	3103617 A1		05-08-1982
			AT	13656 T		15-06-1985
			DE	3263815 D1		04-07-1985
			EP	0057435 A2		11-08-1982
US 3891781	A	24-06-1976	DE	2244065 A1		14-03-1974
			AT	335950 B		12-04-1977
			AT	772473 A		15-08-1976
			AU	475855 B		02-09-1976
			AU	6015973 A		13-03-1975
			BE	804533 A1		06-03-1974
			CA	1014876 A1		02-08-1977
			CS	168671 B2		29-06-1976
			DD	110051 A5		05-12-1974
			FR	2198994 A1		05-04-1974
			GB	1410450 A		15-10-1975
			JP	49066896 A		28-06-1974
			JP	57022548 B		13-05-1982